Cryptogamie, Mycol. 1993, 13 (3): 193-202

CONTAMINATION FONGIQUE DE SALAISONS SÈCHES DE VIANDE: ORIGINE, CONDITIONS D'APPARITION, PRÉVENTION

Joseph LE BARS et Pierrette LE BARS

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, 180 Chemin de Tournefeuille, 31931 Toulouse

RÉSUMÉ - Des altérations fongiques tardives de salaisons sèches de viande étaient dues au *Penicillium frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Wehmer) Westling) sur le corps des saucissons et à l'*Aspergillus repens* de Bary (= *Eurotium repens* de Bary) aux extrémités. L'analyse des matières premieres, de l'air et des surfaces des différentes salles et du matériel ont mis en évidence l'origine de ces contaminants: - l'*A. repens* provenait du poivre; le *P. frequentans* présent dans toute l'entreprise, se développait dans les séchoirs. L'étude écologique de ces deux especes comparativement au *P. nalgiovense* Laxa (la "fleur" ensemencée) explique la localisation et le moment de leur développement. Des contaminations volontaires aux différents stades ont montré que la période sensible se situe en amont des étuves. Un ensemble de mesures (décontamination du poivre, modifications dans les séchoirs pour limiter le développement du *P. frequentans*, réduction du croisement des circuits) ont éliminé plus de 80% des altérations ultérieures. La recherche de souches de *P. nalgiovense* et *P. chrysogenum* Thom plus competitives compléterait cette prevention.

ABSTRACT - Delayed fungal impairments ("green mold") appeared in mold ripened sausages: *Penicillium frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Wehmer) Westling) on the sausage body and *Aspergillus repens* de Bary (= *Eurotium repens* de Bary) on the ends. Mycological studies on raw materials, air and surfaces of different rooms led to determine their origins: - *A. repens* came from pepper; - *P. frequentans*, present everywhere in the factory, grew in ripening rooms. Ecological study of these species, in comparison with *P. nalgiovense* Laxa (starter mold), explained their development localisation and period. Experimental contaminations at different steps of the process outlined that the critical moment took place before incubators. Comprehensive measures to limit development (in ripening rooms), origin and cross contamination eliminated more than 80% impairments. Investigations on more competitive strains of *P. nalgiovense* and *P. chrysogenum* Thom would improve such a prevention.

MOTS CLÉS : salaisons, moisissures, *Penicillium frequentans*, prévention.

INTRODUCTION

La salaison est un mode de préparation et de conservation de la viande qui fait appel à un ensemble de techniques comprenant le salage, la dessication et la fermentation. Dans l'industrie, cette dernière est dirigée par l'apport de microorganismes spécifiques en tant qu'agents de maturation, ayant chacun un rôle particulier: bactéries, levures et champignons filamenteux. Ces derniers, dénommés "la Fleur" par les professionnels, ont pour but d'obtenir une couver-

ture uniforme des produits participant ainsi à une meilleure maîtrise des différents aspects de la qualité: présentation, hygiène, goût. Les souches principalement utilisées appartiennent à l'espèce *Penicillium nalgiovense* Laxa, depuis les nombreux travaux effectués en Allemagne sur ce sujet (voir les mises au point de Benard & Labie, 1977 et de Moreau, 1978), notamment ceux de Mintzlaff & Leistner (1972).

Malgré l'emploi d'une telle flore de surface, une grande entreprise de salaisonnerie subissait un préjudice croissant (disqualification, retour de marchandises) du fait du développement tardif de "moisissure verte" sur des saucissons et des saucisses sèches.

L'objet de cette communication est de rapporter la stratégie suivie et les résultats obtenus dans l'analyse d'un tel problème de contamination dans une industrie agro-alimentaire relativement complexe du fait de la diversité des matières premières, des étapes technologiques et des microorganismes utilisés:

- nature des contaminants:
- leurs conditions de développement comparativement à la "fleur" ensemencée,
- leur origine: les matières premières, l'usine, la conservation,
- les moments critiques de la contamination.

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Nature des contaminants

A partir d'une trentaine d'échantillons (saucissons, saucisses sèches) macroscopiquement contaminés, les "moisissures vertes" furent isolées sur un milieu gélosé au malt (2 %) hypersalé (NaCl 3 %, comme les salaisons). Elles furent identifiées selon les techniques et critères de Raper & Thom (1968) pour le genre *Penicillium* et ceux de Raper & Fennell (1965) pour le genre *Aspergillus*.

L'objectif majeur de cette première étape étant de déterminer si la nature de ces contaminations était constante ou non dans cette entreprise, ces observations ont porté sur plusieurs lots de fabrication, après conservation des produits pendant un à deux mois dans les conditions habituelles de distribution: sous emballage, sous cellophane perforée ou sous atmosphère modifiée (N_2 + CO_2).

2. Etude comparative de la croissance des souches isolées

Pour la comparaison de la croissance des trois espèces isolées en fonction de la température, les souches furent ensemencées au centre de boîtes de Pétri (90 mm) sur le milieu précédent à raison de trois répétitions par souche; au cours de l'incubation à 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35°C, la croissance radiale fut mesurée quotidiennement pendant 3 semaines. L'influence comparée de la concentration en NaCl (1, 3, 6 et 9 %) fut examinée selon la même technique au cours de l'incubation à 15°C, température des séchoirs.

La compétition entre les deux espèces fongiques contaminantes et la "fleur" *(Penicillium nalgiovense)* fut estimée par la dominance éventuelle après croisement des lignes d'ensemencement sur le milieu au malt hypersalé (3 %) incubé à 15°C.

3. Recherche de l'origine des contaminants

Le *P. frequentans* et l'*A. repens* ont été recherchés dans toutes les matières premières: mêlée, viande et résidus au poussage, menu de porc, chaudin, ficelle, poivre, talc et la suspension de la flore d'ensemencement. Des prélèvements de surface furent effectués à l'aide de coton-tiges stériles humidifiés sur $10cm^2$ délimités par des pochoirs stériles sur les tapis de transport, les surfaces de travail, le matériel, les chariots avec les barres de suspension des produits, les climatiseurs...; l'extrémité des coton-tiges est sectionnée et fortement agitée dans 5 ml de solution aqueuse de Tween 80 (0,5‰); les suspensions, avant et apres dilution, sont ensemencées sur le milieu au malt hypersalé (3 ‰).

Des prélèvements d'air (30 à 150 litres) ont été réalisés tout au long des circuits de la fabrication à l'aide de l'appareil à cribles successifs d'Andersen (1958), équipé du milieu au malt hypersalé. L'analyse qualitative (structure du nuage particulaire,...) et quantitative (concentration en particules portant au moins l'un des contaminants fongiques) fut effectuée selon une méthode décrite précédemment (Le Bars, 1968).

La localisation de l'apparition macroscopique des contaminants dans les différents séchoirs fut relevée pendant deux mois. L'humidité relative (H.R.) fut enregistrée en permanence dans ces différentes zones; l'H.R. moyenne fut déterminée par la mesure de l'aire sous la courbe de chaque cycle (100 minutes) de variation de l'H.R. imposée par la technologie (tableau 1).

Etapes	Durée	Température	Hygrométrie
Fabrication de la mêlée	24 h	0 - 2°C	85 %
Poussage et ensemencement	2 h	10 - 15°C	80 %
Etuves	70 h	25 → 15°C	100 → 80 %
Séchoirs	10-30 j	12 - 15°C	cycles 60 à 80 % (100h)

Tableau 1: Durée et caractéristiques hygro-thermiques des principales étapes de la fabrication des saucissons.

Table 1: Period and hygro-thermal characteristics of the main steps in cured dried sausage manufacture.

4. Détermination du moment principal de la contamination

Après fabrication des produits et leur ensemencement par la fleur, des contaminations volontaires ont été effectuées par application sur des saucissons (18 par lot) de cultures de la même souche de *P. frequentans* à différents stades (tableau 1): à l'entrée dans une étuve, dans un séchoir et après deux semaines de séchage. Dans le séchoir, ces lots ont été placés dans des zones qui s'avéraient plus favorables à ce contaminant. Le délai et la fréquence d'apparition de la "moisissure verte" furent relevés au cours des 5 semaines après la fabrication.

II - RESULTATS

1. Nature des contaminants

Les souches de "moisissures vertes" isolées du corps des saucissons et des plis de saucisses appartenaient toutes à l'espèce *Penicillium frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Wehmer) Westling); celles isolées de l'extrémité supérieure des saucissons, près du point d'attache, étaient l'*Aspergillus repens* de

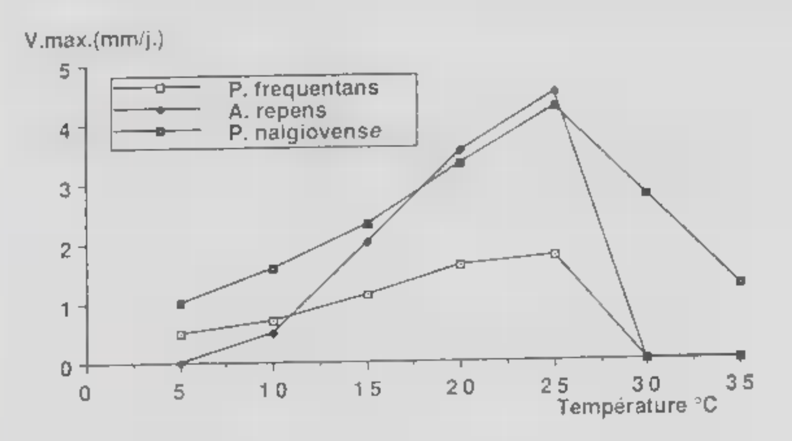


Figure 1 - Vitesse maximale de croissance des deux contaminants de salaisons et de la "fleur" *(P. nalgiovense)* en fonction de la température.

Figure 1: Maximal growth rate (mm/day) of the two fungal contaminants of cured dried sausages comparatively to the starter *(P. nalgiovense)* according to temperature.

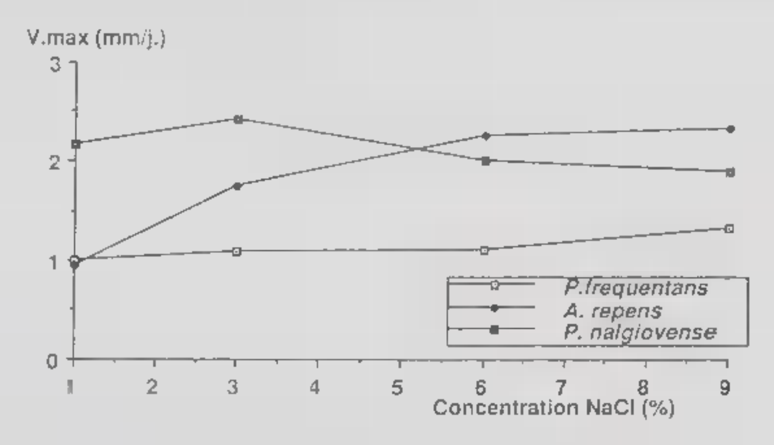


Figure 2 - Vitesse maximale de croissance des deux contaminants de salaisons et de la "fleur" *(P. nalgiovense)* en fonction de la concentration en NaCl.

Figure 2 - Maximal growth rate (mm/day) of the two fungal contaminants of cured dried sausages comparatively to the starter *(P. nalgiovense)* according to NaCl content.

Bary (= *Eurotium repens* de Bary). La flore fongique d'ensemencement était le *P. nalgiovense* Laxa.

2. Etude comparative *in vitro* des trois espèces

L'ensemble des mesures de croissance radiale peut se résumer par le calcul et la représentation de la vitesse maximale de croissance en fonction du paramètre étudié (figures 1 et 2). La température optimale de croissance fut voisine de 25 °C pour les trois souches. Le *P. nalgiovense* présenta la plus large gamme de températures favorables (< 5°C - > 35°C); à une température de 10-12°C, sa vitesse d'extension fut le double de celle des contaminants. A 30°C, la croissance des deux contaminants fut inhibée, tandis qu'à 5°C seul le *P. frequentans* se développa de façon notable.

L'ensemble de l'étude de la croissance en fonction de la concentration en NaCl est résumé dans la figure 2. Le *P. frequentans* apparait indifférent à la concentration, tandis que l'*A. repens* manifeste une nette halophilie. Quant à la souche de *P. nalgiovense*, sa vitesse de croissance, peu influencée par la teneur en sel, fut à la fois maximale et nettement supérieure à celle des contaminants pour une concentration en sel de 3 %.

L'étude de compétition *in vitro* entre les trois souches mit en évidence que le *P. frequentans*, malgré une vitesse de croissance inférieure, dominait toujours la fleur après une semaine de culture. Par contre, l'*A. repens* fut nettement dominé par le *P. nalgiovense* et le *P. frequentans*, dans les conditions de concentration en sel (3 %) et de température analogues à celles de la fabrication.

3. Origine des contaminants

- Les matières premières:

De toutes les matières premières, seul le poivre, théoriquement décontaminé, présentait une mycoflore abondante:

Aspergillus gr. *glaucus* (dont *A. repens*)	$4,5.10^5$/gramme
A. restrictus	6.10^4
A. candidus	4.10^4
A. versicolor	$1,5.10^4$
A. niger	5.10^3
A. wentii	6.10^3
A. flavus	4.10^3
Penicillium spp	6.10^3
(*P. frequentans* non détecté)	

- L'entreprise:

Les prélèvements de surface en amont des salles-étuves furent négatifs pour le *P. frequentans*, à l'exception des chariots et des barres pour la suspension des produits, qui circulent de la salle de poussage aux séchoirs et inversement (120 à 1800 propagules/10 cm²).

La contamination aérienne par cette espèce était générale dans l'entreprise (tableau 2), avec un niveau élevé dans les séchoirs, surtout en fin de cycle (11660 particules/m³ véhiculant au moins un propagule de *P. frequentans*). Parmi les autres espèces fongiques, des *Cladosporium*, contaminants fréquents des entreprises agro-alimentaires traditionnelles, étaient présents sur toutes les instal-

Lieu / Espèces	A.E.	Fab.	A.C.	Pouss-Ens		Passage	Etuves Déb.	Etuves Fin	Séchoirs Déb.	Séchoirs Fin	Talcage
P. frequentans		**50**		**320**	**200**	**215**	**28**	**35**	**2110**	**11660**	**2100**
Autres *Penicillium*		150	6	80	120	210	42	71	9		
Asp. gr. glaucus			3	80	72	27	7	18			
A. versicolor		30				18	7				
Cladosporium sp	133	40	3	9	15		14	107			
Autres dématiées	490	87		18							
P. nalgiovense		*1170*		*7360*	*7170*	*26800*	*4130*	*2700*	*80300*	*214300*	

Tableau 2: Etude qualitative et quantitative (nombre de propagules par m^3) de la mycoflore halotolérante (milieu au malt hypersalé, NaCl 3%) de l'air de différentes salles de l'entreprise de salaisonnerie. - A.E.: air extérieur, au niveau de la production frigorifique. Fab: salle de fabrication (ventilation en marche). A.C.: air comprimé (détendu sous une bâche). Pouss-Ens: salle de poussage et ensemencement de la "fleur". Passage: passage vers étuves (proche de la réserve des barres de bois). Etuves: déb. début (3 h après désinfection); fin: fin d'étuvage. Séchoirs: début (déb.) et fin de cycle. Talcage: brossage + talc.

Table 2: Qualitative and quantitative (propagule number / m^3) of halotolerant mycoflora (malt medium with 3% NaCl) in the air of different rooms along the cured sausage factory. - A.E.: external air, close to refrigerating unit. Fab.: mixing room (ventilation on). A.C.: compressed air (expanded under a plastic sheet). Pouss-ens.: sausage making and fungal starter seeding. Passage: way to incubators (close to wooden bars for sausage hanging). Etuves: incubators: déb = start (3h after disinfection); fin = end of incubation. Séchoirs: drying and ripening step; déb = start; fin = end. Talcage: sausage brushing + talc powdering.

lations (5 à 10 propagules/10 cm^2) et dans l'air de toutes les salles, principalement en amont, près des sources de conditionnement d'air.

La fréquence et l'importance du développement macroscopique du *P. frequentans* étaient plus grandes dans les zones des séchoirs où l'humidité relative, surtout l'H.R. minimale, était plus élevée (figure 3).

4. Moment critique de la contamination

Les résultats de l'essai de contamination volontaire sont représentés sur la figure 4. Pratiquement toutes les unités ensemencées avant l'entrée dans les étuves présentaient un développement macroscopiquement visible du *P. frequentans* à la fin du séchage (5 semaines); par contre, les contaminations tardives, après un début de séchage ne provoquaient pas d'altération visible.

III - DISCUSSION

Les produits non stérilisés issus des industries agro-alimentaires sont parfois le siège de développement de moisissures indésirables. Une prévention

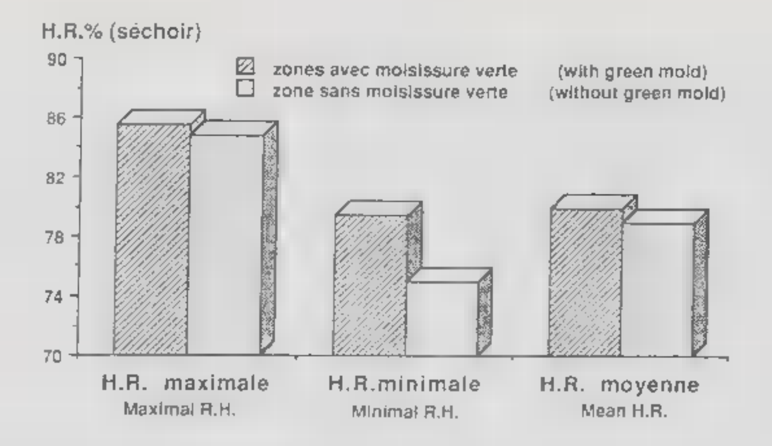


Figure 3 - L'humidité Relative (H.R.) maximale, minimale et moyenne dans les zones des séchoirs avec et sans développement de "moisissures vertes".

Figure 3 - Maximal, minimal and mean Relative Humidity in areas with or without development of "green molds".

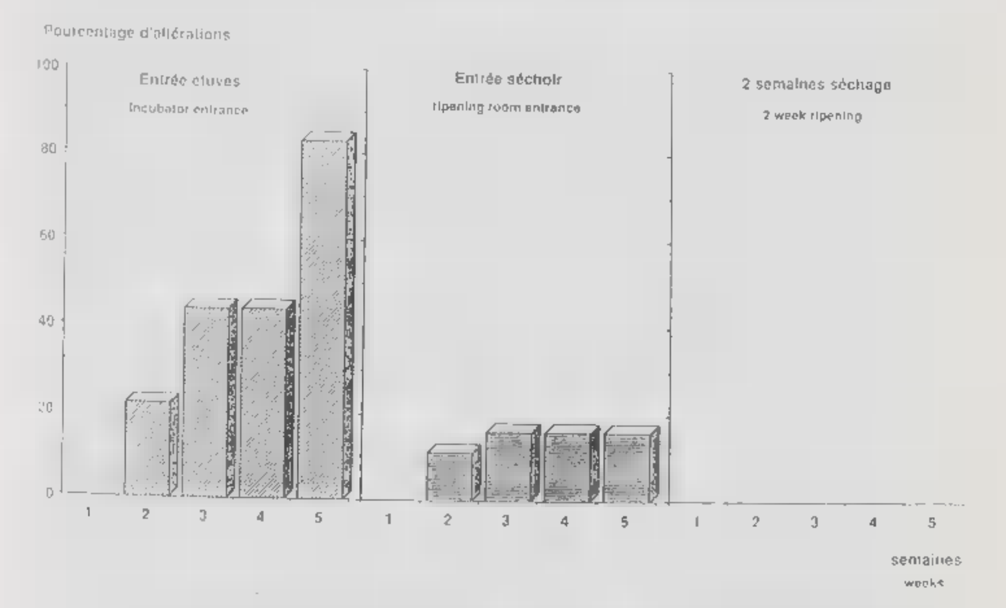


Figure 4 - Pourcentage de saucissons présentant de la "moisissure verte" au cours de la maturation et de la conservation en fonction du moment de la contamination artificielle par une culture de *P. frequentans*.

Figure 4 - Percentages of sausage with the "green mold" development during maturation and storage according to the moment of experimental contamination with a *P. frequentans* agar culture.

raisonnée, surtout dans les industries de fermentation, doit être basée sur la connaissance des agents fongiques, de leur origine, des moments de la contami-

nation et des conditions d'apparition des altérations. Ceci impose généralement l'analyse des différentes étapes en étroite collaboration avec les responsables de la production.

De nombreuses espèces fongiques ont été décrites sur les salaisons sèches de viande (voir les mises au point de Benard & Labie, 1977 et de Moreau, 1978). Dans le cas présent, les défauts d'aspect relevés en fin de maturation et dans les circuits de distribution résultaient toujours des développements des mêmes espèces fongiques. Le contaminant mineur, l'*A. repens*, provenait principalement d'une des matières premières, le poivre: la mesure immédiate consistant à utiliser exclusivement du poivre décontaminé, comme il est recommandé dans ce type d'industrie (Anonyme, 1986; Moreau, 1972; Moreau & Moreau, 1978; Le Bars & Le Bars, 1988) a été suivie par une disparition quasi-totale de ce type d'altération en quelques semaines. Les autres caractéristiques biologiques de l'*A. repens* expliquent la localisation exclusive de son développement à l'extrêmité des saucissons, où la diminution de l'activité en eau et l'accroissement de la concentration en sel limitent l'implantation de la "fleur"; en effet, cette espèce est plus xérophile et halophile et moins compétitive que le *P. nalgiovense*. Enfin, la conservation des produits après maturation à une température inférieure à 10°C devrait, en outre, limiter son développement comparativement à la "fleur".

La contamination majeure était toujours dûe à la même espèce fongique, le *P. frequentans*, quels que soient les lots de fabrication. Non détectée dans les matières premières cette espèce était présente à tous les niveaux de l'entreprise. Compte tenu de ses caractéristiques écologiques, voisines de celles du *P. nalgiovense*, elle se développait surtout dans les séchoirs malgré une bonne implantation préalable de la "fleur"; en effet, son pouvoir de compétition lui permet de s'exprimer à terme malgré un ensemencement et une vitesse de croissance plus faibles que le *P. nalgiovense*.

La contamination volontaire des saucissons à différents stades a permis de préciser le moment le plus important de la contamination: avant l'entrée dans les étuves.

En ce qui concerne la prévention, la pratique d'un vide sanitaire avec désinfection simultanée de l'ensemble d'une telle entreprise est irréaliste, car il la condamne à un arrêt de deux mois pour l'obtention et la fourniture de produits finis.

L'ensemble des observations et des résultats a permis de mettre en place une prévention visant, d'une part, à réduire la source du *P. frequentans*, entretenue au sein de l'entreprise, et, d'autre part, à en limiter la dissémination.

• L'efficacité de la désinfection de chaque séchoir, en fin de cycle de maturation, a été améliorée par l'emploi d'un procédé de thermonébulisation, assurant une meilleure diffusion et stabilité de l'aérosol. L'obtention d'une plus grande homogénéité de l'humidité relative au cours des cycles de variation a permis de réduire les zones à risques et, de ce fait, le développement du contaminant. Ces mesures ont conduit, en moins de deux mois, à une pollution cent fois moins importante dans les séchoirs en fin de cycle, principale source du *P. frequentans* (figure 5).

• La réduction de la dissémination des spores a été assurée par la mise en place progressive d'un ensemble de dispositions habituelles: - désinfection du matériel roulant (chariots) avant leur retour à la salle de fabrication; - limitation au minimum du croisement des circuits; - mise en surpression de l'air de la salle

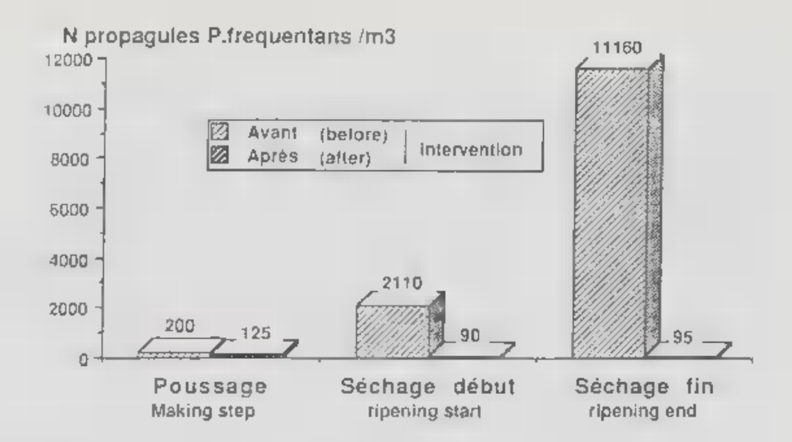


Figure 5 - Pollution de l'air par le *P. frequentans* avant et après la mise en place de la prevention.

Figure 5 - Aerial contamination levels for *P. frequentans* before and after application of prevention measures.

de poussage-ensemencement; - formation et participation active du personnel à cette opération de prévention.

Au cours de l'année qui a suivi la mise en place de ces dispositions, l'importance des altérations fongiques a été reduite de plus de 80 %.

Dans la littérature (voir les mises au point de Benard & Labie, 1977 et de Moreau, 1978), de nombreux contaminants fongiques, parmi lesquels les deux espèces étudiées sont relativement fréquentes, ont été relevés sur les salaisons sèches de viande il y a plus de 15 ans, principalement à l'étranger, sans préciser les mécanismes et l'origine de ces contaminations. Il conviendrait de vérifier, dans le contexte actuel de la technologie, sur l'ensemble de la production quelle est la nature, la fréquence et l'importance de ces altérations. En effet, à l'heure où l'on prône la qualité des denrées, la moindre altération (aspect, goût, innocuité, ...) jette le discrédit sur un type de produit.

Dans ce domaine de production agro-alimentaire, le *P. nalgiovense* apparait particulièrement adapté aux fonctions qui lui sont dévolues; en particulier, il présente, comparativement aux contaminants examinés, une plus grande vitesse de croissance, une plus large gamme de températures favorables et un optimum de croissance à la concentration en sel utilisée. D'autre part, il empêche le développement de moisissures indésirables si la contamination est nettement postérieure à son implantation. Par contre, le pouvoir de compétition de la souche utilisée est mis en défaut pour certaines contaminations précoces *(P. frequentans)*; aussi, un des éléments biologiques complémentaires de la prévention devrait être la recherche de souche de "fleur" *(P. nalgiovense, P. chrysogenum)* plus compétitives.

REFERENCES

ANDERSEN A.A., 1958 - New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriol.* 76: 471-484.

Anonyme, 1986 - Arrêté du 01-09-1982, modifié par A. du 06-01-1986, J. Off. Rép. Fr. du 28-01-1986 - Arrêté 04-08-1986; J. Off. Rép. Fr. du 22-08-1986.

BENARD G. et LABIE C., 1977 - Moisissures et mycotoxines dans les salaisons de viande sèches. *Rev. Méd. Vét.* 128: 795-995.

LE BARS J., 1968. Flore atmosphérique des locaux d'élevage en aviculture. Propriétés physiques et biologiques. *Rev. Méd. Vét.* 144: 1163-1189.

LE BARS J. et LE BARS P., 1988. Contamination fongique et mycotoxique des plantes pour infusions et de condiments. *Bull. Soc. France Mycol. Méd.* 17: 379-384.

MINTZLAFF H.J. und LEISTNER L., 1972 - Untersuchungen zur Selektion eines technologisch geeigneten und toxikologisch unbedenklichen Schimmelpilz-Stammes für die Rohwurst-Herstellung. *Zbl. Vet. Med., B,* 19: 291-300.

MOREAU C., 1972 - Contrôle mycologique d'une station de surgélation de plats cuisinés. *Rev. Gén. Froid* 63: 691-696.

MOREAU C., 1978 - Moisissures et mycotoxines dans les viandes et les produits de charcuterie. Brest, Univ. Bret. Occid., 25p.

MOREAU C. et MOREAU M., 1978 - La contamination des épices, ses conséquences dans les industries alimentaires. *Ind. Alim. Agric.*, 497-502.

RAPER K.B. and FENNELL D.I., 1965 - *The genus Aspergillus.* Baltimore, Williams & Wilkins Co, 686p.

RAPER K.B. and THOM C., 1968 - *A manual of the Penicillia.* N.Y., Hafner Pub. Co., 875p.